

Skeletal muscle mitochondrial clearance

Citation for published version (APA):

Leermakers, P. A. (2019). *Skeletal muscle mitochondrial clearance: translation to COPD*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. ProefschriftMaken Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20190405pl>

Document status and date:

Published: 01/01/2019

DOI:

[10.26481/dis.20190405pl](https://doi.org/10.26481/dis.20190405pl)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

9

Summary

Summary

Skeletal muscle weakness is common in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and contributes to increased morbidity, mortality, and decreased health status. In addition to the loss of muscle mass, loss of skeletal muscle oxidative capacity is a well-established driver of skeletal muscle weakness in COPD patients. Skeletal muscle oxidative capacity is mainly determined by mitochondrial quantity, which is regulated by the balance between mitochondrial biogenesis and mitochondrial clearance. The latter can be achieved via several routes, including mitophagy and via secretion of mitochondria-containing extracellular vesicles. Although mitochondrial biogenesis has been studied extensively in the skeletal muscle of COPD patients, little is known about mitochondrial clearance. The general aim of this thesis was to investigate if COPD-related manifestations including muscle disuse, systemic inflammation, and more speculatively, iron deficiency, result in the onset of mitochondrial clearance, and consequently in the loss of muscle oxidative capacity.

Chapter 2 describes a literature review in which several extra-pulmonary manifestations of COPD, *i.e.* muscle disuse, systemic inflammation, hypoxia, and iron deficiency, which have previously been associated with the loss of skeletal muscle oxidative capacity, are described as possible triggers for skeletal muscle mitophagy. As some of these manifestations are also present in congestive heart failure (CHF) and type 2 diabetes (T2D), a comparable regulation of mitophagy-induced loss of muscle oxidative capacity in these disorders was proposed. Moreover, it was noted that mitophagy is a mechanism to degrade dysfunctional mitochondria in physiological conditions, and that inhibition of mitophagy via pharmacological intervention might result in increased mitochondrial damage and aggravation of muscle pathology.

In **chapter 3**, we executed a cross-sectional study investigating if altered molecular mitochondrial breakdown signalling is present in COPD patients. We reported molecular signalling patterns indicative of increased mitochondrial breakdown in skeletal muscle of patients with COPD, which were characterized by loss of muscle oxidative capacity. Furthermore, iron deficient patients had lower BNIP3L protein and higher *BNIP3* mRNA expression levels, while patients with high circulating CRP levels had higher BNIP3 and autophagy-related protein levels. These data suggest that mitochondrial breakdown is increased in patients with COPD, and underlines a possible role for systemic inflammation as a mitochondrial breakdown-inducing manifestation.

In **chapter 4**, we used a murine model of pulmonary-induced systemic inflammation, to study if systemic inflammation is able to result in increased mitophagy- and decreased mitochondrial biogenesis signalling patterns in an isolated setting. Mice were subjected to an intra-tracheal instillation of LPS, and sacrificed 24, 48, 72, 96, or 120h later. Clear signalling patterns indicating a temporal increase in mitophagy and decrease in mitochondrial biogenesis were found in the *m. gastrocnemius* of these mice, without an apparent loss of mitochondrial quantity. These data suggest that one bolus of intra-tracheal LPS instillation results in the temporal modulation of mitochondrial clearance and biogenesis signalling, but is insufficient to result in reductions in mitochondrial content.

To study if short-term muscle disuse results in increased mitophagy- and decreased mitochondrial biogenesis signalling in an isolated setting, we conducted a combined analysis in a murine and a human study model in **chapter 5**. Mice were subjected to 3 days of skeletal muscle unloading via hind-limb suspension and human participants were subjected to 7 days of leg casting. Both in mice (*m. gastrocnemius*) and men (*m. vastus lateralis*) short-term skeletal muscle unloading resulted in molecular marker patterns indicative of increased receptor-mediated mitophagy and decreased transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis, before the loss of mitochondrial content. These results emphasize the early-onset of skeletal muscle disuse-induced mitochondrial remodelling.

To test if mitophagy signalling could also be part of physiological adaptation during recovery from disuse-induced muscle pathology, **chapter 6** first describes a cluster analysis of molecular markers of several mass- and metabolic plasticity-related processes from human participants subjected to 7 days of muscle reloading after 7 days of skeletal muscle casting. This cluster analysis was complemented with a murine time-course study with 1, 2, 3, 5, and 8 days of reloading after 14 days of hind-limb suspension. This chapter describes that the molecular regulation of protein turnover, mitochondrial turnover, and myonuclear turnover are correlated and temporally associated during recovery from atrophy, which suggests an interdependency or joint regulation of these muscle mass- and oxidative metabolism-related processes during recovery from muscle disuse.

In **chapter 7**, we conducted an *in vitro* study to determine if iron chelation results in the decrease of skeletal muscle mitochondrial content and function, and if this decrease is caused by increased mitochondrial clearance via mitophagy. We

show that both mitochondrial-lysosomal localisation, indicative of mitophagy, and secretion of mitochondrial-containing extracellular vesicles (EV) are present in iron chelation-exposed myotubes. Moreover, we show that mitophagy is not essential for development of iron chelation-induced mitochondrial impairments. Together, these results suggest a possible interplay between different pathways of mitochondrial clearance, which may contribute to the mitochondrial impairments observed upon iron chelation.

In **chapter 8**, we discuss and conclude that skeletal muscle mitophagy-regulation is increased in COPD based on current evidence. Whether this is also true for other chronic disorders such as T2D and CHF requires further investigation. Furthermore, we established that systemic inflammation, muscle disuse, recovery after muscle disuse, and iron deficiency are all able to alter mitochondrial clearance regulation in skeletal muscle, but chronic *versus* acute exposure to these triggers needs to be studied in more detail. Interestingly, as skeletal muscle is able to achieve mitochondrial clearance via secretion of mitochondria via EV, this raises the question if muscle cells are also able to integrate functional mitochondria from EV in their mitochondrial network, providing new possibilities for future oxidative capacity preserving or boosting therapies. Since mitochondrial breakdown is an important part of the skeletal muscle recovery process, interfering with mitochondrial clearance itself as oxidative capacity preserving therapy may not be ideal. Future research should therefore also aim to determine whether mitochondrial clearance-induced loss of oxidative capacity can be prevented or restored using lifestyle modifications as well as nutritional or physical interventions.

Nederlandse samenvatting

COPD, de afkorting voor de Engelstalige term Chronic Obstructive Pulmonary Disease, is een veelvoorkomende chronische ziekte waarbij de longen onherstelbaar beschadigd zijn. COPD patiënten hebben niet alleen moeilijkheden met ademen maar ook de skeletspieren in bijvoorbeeld de armen en benen van deze patiënten zijn verzwakt. Spierzwakte verergert de ziektelast en wordt veroorzaakt door verlies van spiermassa en door verlies van oxidatieve capaciteit, het vermogen van de spier om zuurstof te gebruiken. Deze oxidatieve capaciteit wordt voornamelijk bepaald door de hoeveelheid mitochondriën in de spier.

“Mitochondriën zijn organellen welke de ‘energiefabriekjes’ van de cel zijn. In de mitochondriën worden suikers en vetten met behulp van zuurstof omgezet in pakketjes met energie (ATP). Dit ATP kan door de cel gebruikt worden voor allerlei processen, zoals het samentrekken van de spieren. Zonder mitochondriën kan er wel ATP worden geproduceerd, maar dit gaat veel minder efficiënt.”

De aanmaak (biogenese) en afbraak van mitochondriën worden nauwkeurig gereguleerd voor het in stand houden van de totale hoeveelheid mitochondriën in de spier. Tot op heden is alleen de mitochondriële biogenese uitgebreid onderzocht in de skeletspier van COPD patiënten. Er is daarentegen maar weinig bekend over de regulatie van de mitochondriële afbraak of andere processen die bij verlies van mitochondriën betrokken zijn. Mitochondriën kunnen in de cel worden afgebroken door verschillende processen waarvan mitofagie de belangrijkste is. Mitochondriën kunnen ook door de cel worden uitgescheiden via zogenaamde vesikels.

“Mitofagie is een selectieve vorm van autofagie waarbij specifiek mitochondriën worden afgebroken. Tijdens autofagie wordt een autofagosomaal membraan rondom een bepaald stuk cel of organel aangelegd, wat deze isoleert van de rest van de cel. Dit wordt het autofagosoom genoemd. Vervolgens wordt het autofagosoom samengevoegd met een lysosoom, waarin zich eiwitten bevinden die gespecialiseerd zijn in het afbreken van organellen en andere eiwitten. Hier wordt vervolgens de inhoud van het autofagosoom afgebroken. Autofagie wordt mitofagie genoemd als specifiek mitochondriën worden opgenomen en afgebroken in deze autofagosomen en lysosomen. Behalve een autofagosomaal membraan kunnen mitochondriën ook opgenomen worden in vesikels. Tijdens dit proces wordt het te verwijderen mitochondrion omgeven door een membraan en wordt dit membraan met mitochondrion erin volledig door de cel uitgescheiden.”

De overkoepelende hypothese van de studies beschreven in deze dissertatie is dat diverse COPD-gerelateerde manifestaties zoals verminderd spiergebruik door lichamelijke inactiviteit, systemische ontsteking, en mogelijk ook ijzertekort, leiden tot initiatie van mitochondriële afbraak en/of uitscheiding via vesikels, en daarmee tot het verlies van oxidatieve capaciteit in de spier.

In **hoofdstuk 2** wordt een literatuurstudie beschreven waarin we eerst de huidige studies naar mitochondriële afbraak in de skeletspier van de chronische ziektes COPD, Diabetes type 2 (T2D) en hartfalen (CHF) beschrijven. Vervolgens analyseren we wat het huidige bewijs is dat manifestaties die veel voorkomen bij deze ziektes, zoals verminderd spiergebruik, systemische ontsteking, zuurstoftekort en ijzertekort, kunnen aanzetten tot mitochondriële afbraak. We concluderen dat het waarschijnlijk is dat de aanwezigheid van deze manifestaties bij COPD patiënten kunnen leiden tot een verhoogde mitochondriële afbraak. Verder benadrukken we dat de mitochondriële afbraak een belangrijk proces is voor behoud van een gezonde mitochondriële populatie, en dat het remmen van mitochondriële afbraak dus mogelijk niet alleen tot een verhoogde mitochondriële hoeveelheid zal leiden, maar wellicht ook nadelig kan zijn wanneer beschadigde mitochondriën zich ophopen.

Voor **hoofdstuk 3** is een cross-sectionele studie uitgevoerd waarin we de moleculaire signalering die mitochondriële afbraak aanstuurt in COPD patiënten en gezonde controles hebben onderzocht. We beschrijven de aanwezigheid van signaleringspatronen die indicatief zijn voor mitochondriële afbraak in de skeletspier van COPD patiënten waarbij de oxidatieve capaciteit in de spier verlaagd is. Verder laten we zien dat patiënten met een ijzertekort lagere BNIP3L eiwit en hogere *BNIP3* genexpressie hebben, en dat patiënten met hoge systemische ontstekingswaarden hoge BNIP3 en autofagie-gerelateerde eiwit expressie hebben. Gecombineerd maken deze gegevens het aannemelijk dat mitochondriële afbraak verhoogd is in COPD patiënten vergeleken met gezonde controles, en dat systemische ontsteking de mitochondriële afbraak kan verhogen.

“BNIP3 en BNIP3L zijn eiwitten die op mitochondriën zitten en verantwoordelijk zijn voor het rekruteren van autofagosomale membranen tijdens mitofagie. De hoeveelheden van deze eiwitten zijn sterk afhankelijk van de condities waarin de spiercellen zich bevinden en de hoeveelheid eiwitten op mitochondriën kan zeer snel groter of kleiner worden als de spier zich moet aanpassen.”

Om te kijken of systemische ontsteking tot verhoogde signalering van mitochondriële afbraak en verlaagde signalering van mitochondriële aanmaak kan leiden, hebben we in **hoofdstuk 4** muizen blootgesteld aan een injectie met LPS of NaCl in de longen en skeletspieren uit de achterpoot geïsoleerd op 24, 48, 72, 96, en 120u na de blootstelling. We vonden signaleringspatronen die indicatief zijn voor tijdelijk verhoogde mitofagie en verlaagde mitochondriële biogenese, zonder dat dit leidde tot een verlies in mitochondriële massa. Deze resultaten maken het aannemelijk dat één acute LPS-geïnduceerde luchtwegontsteking voldoende is om tijdelijke verhoging in signalering van mitofagie en verlaging van signalering van mitochondriële aanmaak te bewerkstelligen, maar waarschijnlijk onvoldoende is om uiteindelijk te resulteren in een verlies van mitochondriële hoeveelheid.

“Intra-tracheale injectie met LPS (IT-LPS) wordt toegepast in een muizenmodel waar een ontsteking wordt gemodelleerd in de longen van muizen door een bacteriële component (genaamd LPS) via de luchtpijp (trachea) in de longen te injecteren. De longontsteking die hierop volgt bereidt zich vervolgens uit naar het bloed waardoor de ontsteking in het gehele lichaam, en dus ook bij de spieren, terecht komt.”

Vervolgens hebben we in **hoofdstuk 5** gekeken of het kortdurend niet gebruiken van skeletspieren genoeg is om te zorgen voor een verhoogde mitochondriële afbraak en een verlaagde mitochondriële aanmaak signalering in zowel een muizenstudie als een humane studie. We maakten het de muizen onmogelijk om gedurende drie dagen hun spieren in hun achterpoot te belasten, door deze muizen in een harnas te hangen zodat ze alleen met de voorpoten en niet met de achterpoten op de grond konden komen. Bij gezonde vrijwilligers is één been één week lang ingegipst en werd gevraagd om dit been zo veel mogelijk te ontlasten. In dit hoofdstuk laten we zien dat zowel in de spieren van de muizen als ook in de spieren van de mensen het kortdurende verminderd belasten van de spier leidde tot signaleringspatronen welke indicatief zijn voor verhoogde mitofagie en verlaagde regulatie van mitochondriële aanmaak, nog vóór het verlies van mitochondriële hoeveelheid meetbaar is. Deze resultaten tonen aan dat als spieren niet belast worden, processen van mitochondriële regulatie snel veranderen ten nadele van de oxidatieve capaciteit.

In **hoofdstuk 6** hebben we onderzocht of mitofagie-signalering ook onderdeel is van de herstelrespons van de spier na een periode van verminderde belasting van de spier. Om dit te bewerkstelligen hebben we veranderingen in verschillende processen vergeleken in de beenspier van gezonde vrijwilligers

gedurende een één-week-durende herstelperiode na één week van verminderde spierbelasting door ingipsen. Deze analyse hebben we gecombineerd met analyses voor dezelfde signalering in een muizenstudie waarin muizen twee weken hun achterpoot niet konden belasten, gevolgd door een herstelperiode van 1, 2, 3, 5, of 8 dagen. In dit hoofdstuk beschrijven we dat de moleculaire regulatie van spiermassa-herstel geassocieerd is met de moleculaire regulatie van mitochondriële afbraak. Ook laten we zien dat de moleculaire regulatie van mitochondriële afbraak op verschillende momenten gedurende de herstelfase tijdelijk veranderd is. Deze resultaten maken het aannemelijk dat de processen van spiermassa-groei, spiermassa-afbraak en mitochondriële afbraak van elkaar afhankelijk zijn en dat zij samen voor het spierherstel zorgen tijdens de herstelfase na verminderde belasting van de spier.

In **hoofdstuk 7** beschrijven we een *in vitro* studie waarin we hebben bepaald of ijzertekort leidt tot het verlies van mitochondriële massa en functie in spiercellen en of dit verlies wordt veroorzaakt door mitochondriële afbraak via mitofagie. We laten zien dat mitochondriën aanwezig zijn in lysosomale structuren in de cellen die blootgesteld waren aan ijzertekort, wat duidt op meer mitofagie. Deze mitofagie bleek echter niet essentieel te zijn voor het verlies van mitochondriële massa en functie, waaruit we concludeerde dat er nog een ander mechanisme van mitochondrieel verlies geactiveerd moest zijn. Inderdaad deden we een erg interessante en vernieuwende observatie dat mitochondriën aanwezig waren in vesikels die waren uitgescheiden door aan ijzertekort blootgestelde spiercellen, wat een mogelijk alternatief mechanisme is voor het verlies van mitochondriën. Gecombineerd maken deze resultaten het aannemelijk dat ijzertekort leidt tot een dynamisch samenspel van verschillende mechanismen die leiden tot een verlies in mitochondriële hoeveelheid.

In **hoofdstuk 8** bediscussiëren en concluderen we dat de huidige beschikbare wetenschappelijke studies het aannemelijk maken dat mitofagie-signalering verhoogd is in de skeletspieren van COPD patiënten, maar dat de wetenschappelijke onderbouwing hiervoor in patiënten met hartfalen en diabetes type 2 nog niet toereikend is. Verder hebben we het aannemelijk gemaakt dat systemische ontsteking, verminderde spierbelasting, en ijzertekort allen kunnen leiden tot verhoogde mitochondriële afbraak en verlies. Mogelijke verschillen tussen chronische en acute blootstelling aan deze triggers dient echter nog verder onderzocht te worden. Erg interessant is de observatie dat spiercellen mitochondriën via vesikels kunnen uitscheiden, wat leidt tot de nieuwe onderzoeksvraag of mitochondriën via deze vesikels ook intact kunnen

worden opgenomen door spiercellen. Deze onderzoekslijn zou tot onderzoek naar nieuwe therapieën kunnen leiden voor behoud van de oxidatieve capaciteit. Omdat mitochondriële afbraak een essentieel onderdeel is van het herstelproces na spierschade, is het remmen van mitochondriële afbraak ten behoeve van een verhoogde mitochondriële massa niet ideaal. Toekomstig onderzoek zal zich daarom ook moeten bezighouden met de vraag of de initiatie van mitochondriële afbraak kan worden voorkomen met behulp van veranderingen in de levensstijl van patiënten, of het aanpassen van voeding of fysieke training voor patiënten.

